

Flow cytometry assay for intracellular cytokine levels of immune cells includes fixing and permeabilizing the cells with PermeaFix (TM) reagent

Patent number: DE19850049
Publication date: 2000-05-11
Inventor: HEHMKE BERND [DE]
Applicant: INST DIABETES GERHARDT KATSCH [DE]
Classification:
- **international:** G01N33/53
- **european:** G01N33/50D; G01N33/50D6; G01N33/68D
Application number: DE19981050049 19981030
Priority number(s): DE19981050049 19981030

Abstract of DE19850049

Method for determining the intracellular cytokine levels of immune cells in body fluid, organ or tissue samples comprises: (a) isolating mononuclear cells; (b) restimulating the mononuclear cells in vitro; (c) fixing and permeabilizing the cells with PermeaFix (TM) reagent; (d) staining cell-surface antigens and intracellular cytokines; and (e) analyzing the cells by flow cytometry. Method for determining the intracellular cytokine levels of immune cells in body fluid, organ or tissue samples comprises: (a) isolating mononuclear cells by density gradient centrifugation; (b) restimulating the mononuclear cells in vitro; (c) fixing and permeabilizing the cells with PermeaFix (TM) reagent; (d) staining cell-surface antigens and intracellular cytokines with dye-labeled monoclonal antibodies; and (e) analyzing the cells by flow cytometry.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 50 049 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/53

②1 Aktenzeichen: 198 50 049.1
②2 Anmeldetag: 30. 10. 1998
④3 Offenlegungstag: 11. 5. 2000

DE 198 50 049 A 1

⑦1 Anmelder:
Institut für Diabetes Gerhardt Katsch Karlsburg e.V.,
17495 Karlsburg, DE

⑦4 Vertreter:
Meyhöfer, D., Dipl.-Ing. Faching. f.
Schutzrechtswesen, Pat.-Anw., 17489 Greifswald

⑦2 Erfinder:
Hehmke, Bernd, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 17389
Anklam, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

WO 94 26 935 A1
WOITAS, Rainer P., et.al.: CD30 Induction and
Cytokine Profiles in Hepatitis C Virus Core-
Specific Peripheral Blood T Lymphocytes. In:
The Journal of Immunology, 1997, Bd.159, S.1012-
S.1018;
MEDLINE:
1998447466;
1998382070;
Chemical Abstracts:
129:286451;
127:174466;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zur Bestimmung intrazellulärer Zytokine der Immunzellen in biologischen Körperflüssigkeit und Organ- oder Gewebeproben mittels Durchflußzytometrie

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur intrazellulären Zytokinfärbung und durchflußzytometrischen Einzelzellanalyse Zytokin-produzierender Zellen in Proben des peripheren Blutes, anderer Körperflüssigkeiten und der lymphatischen Organe und Gewebe.
Für den intrazellulären Zytokinnachweis werden erfindungsgemäß restimierte mononukleare Zellen in einem Einschnittverfahren unter Verwendung von ORTHO PermeaFixTM-Reagens fixiert und permeabilisiert. Nach dem Waschen mit einem auf ORTHO PermeaFixTM abgestimmten Waschpuffer werden die mononuklearen Zellen in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit Rindersealbumin und Dimethylsulfoxid eingefroren und bei etwa -70°C gelagert. Neben der höheren Testempfindlichkeit besteht der Vorteil des beschriebenen Verfahrens darin, daß sich nach raschem Auftauen der Zellen im Wasserbad Zelloberflächenmarker und intrazelluläres Zytokin ebenfalls in einem Einschnittverfahren mit den entsprechenden Farbstoff-konjugierten monoklonalen Antikörpern anfärben lassen. Zur intrazellulären Bestimmung proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine werden die restimulierten mononuklearen Zellen bei der vorliegenden Methode erst unmittelbar vor der Inkubation mit den konjugierten monoklonalen Antikörpern auf die einzelnen Testansätze verteilt, wodurch sich Arbeitsaufwand und Reagenzienverbrauch gegenüber bekannten Verfahren wesentlich reduzieren. Alternativ können die restimulierten Zellen ohne vorheriges Einfrieren sofort nach der ...

DE 198 50 049 A 1

Die Erfindung umfaßt ein effektives Verfahren zur Bestimmung diagnostisch und pathogenetisch relevanter Zytokine in menschlichen und tierischen Immunzellen aus dem Probengut des peripheren Blutes, anderer biologischer Körperflüssigkeiten und Organ- und Gewebeproben auf Einzelzellebene mit Hilfe der Durchflußzytometrie und kommt als Labor-

methode bei der medizinischen Immun Diagnostik und beim Immunmonitoring zur Anwendung. Zytokine werden vorzugsweise von den Zellen des Immunsystems gebildet. Da die Zytokine eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Immunantwort einnehmen, stellen Verschiebungen der Zytokinbalance einen wesentlichen Faktor bei der Immunpathogenese einer Reihe von Erkrankungen dar. Dazu zählen u. a. die systemischen und organspezifischen Autoimmunerkrankungen, die atopischen Erkrankungen sowie die Transplantat-Abstoßungsreaktion.

Zu den häufig angewendeten Zytokin-Bestimmungsmethoden gehören der Zytokin-ELISA zur Quantifizierung sezernierter Zytokine in Zellkulturüberständen, die Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription der RNS und der Zytokin-ELISPOT-Assay. Neben dem hohen Zeithedarf, großem Arbeitsaufwand und hohen Kosten weisen diese Methoden eine Reihe weiterer Nachteile auf.

Beim Zytokin-ELISA können die Ergebnisse durch Abbau eines Teils der sezernierten Zytokine während der 3–10 Tage dauernden Zellkultur erheblich beeinflußt werden.

Beim Nachweis von Zytokin-mRNS bleibt ungeklärt, ob die genetische Information in biologisch und damit immunregulatorisch wirksames Zytokin umgesetzt wird.

Darüber hinaus gibt keines dieser Verfahren Auskunft über den zellulären Ursprung der sezernierten Zytokine. Stattdessen werden lediglich Summeneffekte von Mischzellpopulationen erfaßt.

Bei der durchflußzytometrischen Methode sind mehrere Vorteile bekannt. So gestattet nur dieses Verfahren, die Zytokin-produzierenden Zellen auf Einzelzellebene zu detektieren. Bei gleichzeitiger Anfärbung der CD-Oberflächenmarker ist eine Zuordnung Zytokin-produzierender Zellen zu spezifischen Monozyten- bzw. Lymphozytensubpopulationen möglich. Mehrere Zytokine pro Zelle können erfaßt und über die Fluoreszenzintensität des Zytokinsignals quantitative Aussagen zur Menge der pro Zelle gebildeten Zytokine getroffen werden. Normalerweise liegen die intrazellulären Zytokin-konzentrationen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze der durchflußzytometrischen Methode. Auch durch Stimulation der Zytokinsynthese wird die Nachweisgrenze nicht überschritten, da die synthetisierten Zytokine sehr schnell in das umgebende Medium sezerniert werden.

Durch Jung, T., et al.: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry, in J. Immunol. Methods 1993, 159, S. 197–207, ist erstmals eine geeignete intrazelluläre Zytokinfärbung für die Durchflußzytometrie beschrieben worden. Das Problem der zu geringen intrazellulären Zytokinkonzentrationen wurde dadurch überwunden, daß während der Restimulation der mononukleären Zellen durch kombinierte Behandlung mit Phorbol 12-myristat 13-acetat und Ionomycin der Proteintransportinhibitor Monensin zugesetzt wurde. Bei dieser Vorbehandlung steigen die intrazellulären Zytokinkonzentrationen durch Akkumulation auf solche Werte an, die eine Detektion über die Durchflußzytometrie zulassen.

Durch Jung, T. et al.: Interleukin-13 is produced by activated human CD45RA⁺ and CD45RO⁺ T cells: modulation by interleukin-4 and interleukin-12, in Eur. J. Immunol. 1996, 26, S. 571–207, ist die Verwendung von Brefeldin A als Proteintransportinhibitor bekannt, eine Substanz, die den intrazellulären Proteintransport noch wirksamer hemmt und dabei eine geringere Zytotoxizität als Monensin zeigt. Nach Prussin, C. und Metcalfe, D. D.: Detection of intracytoplasmic cytokines using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies, in J. Immunol. Methods 1995, 188, S. 117–128, erweisen sich direkt mit Fluorochromen konjugierte monoklonale Zytokin-Antikörper bei der intrazellulären Zytokinfärbung für die Durchflußzytometrie als am besten geeignet. Auf Grund der Undurchlässigkeit der Zellmembranen für solche Antikörper müssen die restimulierten Zellen vor der Anfärbung in einem kritischen Verfahrensschritt fixiert und permeabilisiert werden. Während die bekannten Formaldehyd- und Paraformaldehydmethoden bei der Zellfixierung sehr zuverlässig sind, resultieren die erheblichen Probleme bei den meisten der bisher angewendeten intrazellulären Protokolle aus der Verwendung Saponin enthaltender Permeabilisierungsreagenzien.

Nach Fast Immune Cytokine System, Applikation von Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 1996, S. 5, wird Saponin aus Pflanzen gewonnen und führt auf Grund seiner heterogenen Zusammensetzung und der Verwendung unterschiedlicher Ausgangsmaterialien zu einer erheblichen Variabilität bei der intrazellulären Zytokinfärbung.

Durch IC ScreenTM Intracellular Staining Kit, Applikation von BioSource International, Inc., S. 4–19, sind Kits zur intrazellulären Zytokinfärbung bekannt, die deshalb eine Permeabilisierungskontrolle zur Überprüfung des Saponin-Effektes enthalten.

Dieses bedeutet, daß bei nachgewiesener erfolgloser oder partieller Saponin-Permeabilisierung mit diesem Test-Kit zum intrazellulären Zytokinnachweis erhobene Befunde nicht verwertbar sind. Darüber hinaus ist die Membranpermeabilisierung mit Saponin reversibel, so daß dieses Reagens zusätzlich zum eigentlichen Permeabilisierungsschritt bei der nachfolgenden Inkubation der Zellen mit monoklonalen Zytokin-Antikörpern und den Waschschritten zur Eliminierung nicht gebundener Antikörper ebenfalls zugegen sein muß. Ein weiterer Nachteil nahezu aller bekannten Verfahren besteht darin, daß die Fixierung und Permeabilisierung nacheinander in zwei getrennten Arbeitsschritten durchgeführt werden.

Als geeignete Produkte zur Fixierung und Permeabilisierung nach dem Zweistufenverfahren sind Fix & Perm[®], Applikation der Caltag Laboratories, Inc., 1998, S. 12; Cytodetect Reagent F und F, CytodetectTM Kit, Applikation von Immuno Quality Products, 1997, S. 1–11; IC-FixTM und IC-PERMTM der Bio-Source GmbH; IntraStain, Applikation der DAKO Diagnostika GmbH, 1998, S. 1–4; sowie Intra-PrepTM Permeabilization Reagent, Applikation der Coulter Immunotech Inc., 1998, S. 1–4 bekannt geworden.

Das einzige Reagens, mit dem bisher Fixierung und Permeabilisierung beim intrazellulären Zytokinnachweis in einem Schritt durchgeführt worden sind, ist das Kit Cytofix/CytopermTM, welches in Research Products Catalog von Pharmingen, 1998, S. 744–749 beschrieben ist. Die Verwendung von Cytofix/CytopermTM ist jedoch an die Bedingung geknüpft, daß die nachfolgende Anfärbung der intrazellulären Zytokine in dem zur Aufrechterhaltung der Membranpermeabilisierung mitgelieferten Perm/WashTM-Puffer erfolgt. Es ist erforderlich, die Anfärbung der Zelloberflächenmarker in einem

zusätzlichen Arbeitsschritt vor der Umsetzung mit Cytofix/Cytoperm™ vorzunehmen.

Bei allen bisher bekannten Fixierungs- und Permeabilisierungsverfahren für den intrazellulären Zytokinnachweis wird in der Regel die Bindung der Zelloberflächen-Antikörper beeinflusst, so daß sich insgesamt vier Arbeitsschritte in folgender Reihenfolge ergeben: Fluoreszenzmarkierung der Zelloberflächenantigene mit Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern, Zellfixierung, Zellpermeabilisierung und Anfärbung der intrazellulären Zytokine mit Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Zytokin-Antikörpern.

Die Erhebung diagnostisch relevanter Befunde setzt die Bestimmung mehrerer proinflammatorischer und antinflammatorischer Zytokine voraus, die sowohl in der Population der CD4⁺ T-Helferzellen als auch in den CD8⁺ zytotoxischen/T-Suppressorzellen erfolgen sollte. Bei der bisherigen Verfahrensweise müssen die vom Probanden oder vom Versuchstier gewonnenen Zellproben schon nach der Restimulation auf eine Vielzahl von Testansätzen verteilt werden, die in den nachfolgenden Schritten einzeln zu handhaben sind. Daraus ergeben sich ein entsprechend hoher Arbeitsaufwand und ein großer Reagenzienverbrauch bei der Fixierung und Permeabilisierung.

Die Aufgabe der Erfindung ist ein effektives Verfahren, mit dem unter der Anwendung der Durchflußzytometrie in den Immunzellen pathogenetisch und diagnostisch relevanter Zytokine auf Einzelzelebene qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden können. Durch einen wesentlich verringerten technischen Aufwand, einer höheren Testempfindlichkeit im Vergleich zu den bekannten Verfahren und eine dadurch bedingte verbesserte Diskriminierung zwischen Zytokinpositiven und Zytokin-negativen Immunzellen soll erreicht werden, daß das erfindungsgemäße Verfahren zum intrazellulären Zytokinnachweis als Routine-Labormethode bei der Immundiagnostik und beim Immunmonitoring Anwendung findet.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß zur durchflußzytometrischen Analyse Zytokin-produzierender Immunzellen aus dem Probengut des peripheren Blutes, anderer Körperflüssigkeiten und der Organe und Gewebe sowohl die Zellfixierung und Permeabilisierung als auch die Anfärbung von Zelloberflächenantigenen und intrazellulären Zytokinen unter Verwendung Fluorochromkonjugierter monoklonaler Antikörper in zwei aufeinander folgenden Einzelschrittverfahren erfolgen, wobei die Zellfixierung und Permeabilisierung sowie die nachfolgende Fluoreszenzmarkierung von Zelloberflächenantigenen und intrazellulären Zytokinen jeweils in einem einzigen Verfahrensschritt durchführbar sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht im einzelnen darin, daß zunächst durch Dichtegradientenzentrifugation über Histopaque-1077, FicoP/Urografin oder CellSep Lymphocytes aus dem Probengut die mononukleären Zellen nach bekannten Standardverfahren gewonnen werden. Die mononukleären Zellen werden anschließend in Kulturmedium RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum durch Behandlung mit dem Proteinkinase C-Liganden Phorbol 12-myristat 13-azetat und dem Antibiotikum Ionomycin in Gegenwart des Proteintransport-Inhibitors Brefeldin A über 4 Stunden unter Kulturbedingungen restimuliert. Die dabei verwendeten Substanzen und Konzentrationen sind mit denen bekannter Verfahren identisch. Die Nachteile bei der bekannten Verfahrenstechnik zum intrazellulären Zytokinnachweis werden erfindungsgemäß durch die Anwendung von ORTHO PermeaFix™ bei der Fixierung und Permeabilisierung der restimulierten mononukleären Zellen ausgeschlossen.

Erfindungsgemäß erfolgt bei der gesamten Probe der restimulierten Zelle mit dem ORTHO PermeaFix™-Reagens die Fixierung und Permeabilisierung in einem Einzelschrittverfahren, wobei dieses Reagens die Expression lymphozytärer Oberflächenmarker wie CD2, CD3, CD4, CD8, CD16 und CD19 nicht beeinträchtigt. Deshalb ist es möglich, nach Behandlung der Zellen mit ORTHO PermeaFix™ Zelloberflächenmarker und intrazelluläre Antigene ebenfalls in einem Einzelschrittverfahren anzufärben. Dies führt zu einer höheren Empfindlichkeit des Tests, da bei vorgeschalteter Oberflächenmarkierung die Zytokine auf Grund der reversiblen Wirkung des Proteintransportinhibitors Brefeldin A teilweise aus den Zellen austreten.

Unvollständige Permeabilisierungen, die bei der Verwendung konventioneller Saponin enthaltender Reagenzien beobachtet werden und in bekannter Weise zum Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bei der durchflußzytometrischen Zytokinbestimmung führen können, treten durch Behandlung der Zellen mit ORTHO PermeaFix™ nicht auf. Nach der Umsetzung mit ORTHO PermeaFix™ werden die Zellen gewaschen, in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit 1% Rinderserumalbumin und 10% Dimethylsulfoxid eingefroren und bei -70°C gelagert. Verfahrensgemäß muß die restimulierte mononukleäre Zellprobe erst nach raschem Auftauen bei 37°C auf die einzelnen Testansätze verteilt werden. In diesen Einzelproben lassen sich Zelloberflächenantigene und intrazelluläre Zytokine ebenfalls in einem Einzelschrittverfahren mit konjugierten monoklonalen Antikörpern anfärben, wobei das zur Permeabilisierung verwendete Reagens nicht zugegen sein muß. Da ORTHO PermeaFix™ die Antikörperbindung an lymphozytären Oberflächenmarkern wie CD3, CD4 und CD8 nicht beeinträchtigt, wird mit diesem Reagens die aufwendige separate Markierung der Oberflächenantigene vor der Fixierung oder Permeabilisierung umgangen. Bei gleichzeitiger Senkung des Reagenzien-Verbrauchs entfällt dadurch die vorzeitige Aufteilung des Untersuchungsgutes auf die einzeln zu handhabenden Testansätze. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelten Zellproben sind zur durchflußzytometrischen Bestimmung Zytokin-produzierender Zellen geeignet. Bei erhöhter Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit wird verfahrensgemäß der technische Aufwand beim intrazellulären Zytokinnachweis soweit verringert, daß das Verfahren als Routine-Labormethode bei der Immundiagnostik und beim Immunmonitoring anwendbar ist.

Nachstehend soll das erfindungsgemäße Verfahren zum intrazellulären Zytokinnachweis anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert werden.

In dem Beispiel wird die Bestimmung der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF-α), Interleukin(IL)-2, Interferon gamma (IFN-γ) und IL-4 produzierenden CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten im peripheren Blut eines Probanden mit Autoimmun-Typ 1-Diabetes beschrieben.

In konischen 15 ml Zentrifugenröhrchen werden zunächst 3 ml einer 1 : 1 mit Hank'scher Lösung verdünnten Blutprobe über 3 ml Histopaque-1077 in einer Zeitdauer von 30 Minuten mit 400 xg zentrifugiert und die mononukleären Zellen PBMC aus der Interphase gewonnen.

Nach dem Waschen werden die mononukleären Zellen PBMC in Kulturmedium RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml resuspen-

diert. In die Vertiefungen einer 24-Lochplatte in Flachbodenausführung werden jeweils 1.5×10^6 Zellen in 750 µl komplettem Kulturmedium pipettiert und nochmals 750 µl Kulturmedium mit der doppelten Konzentration der zur Restimulation der mononukleären Zellen PBMC verwendeten Substanzen zugegeben. Durch Mischen der beiden 750 µl Aliquote werden die Endkonzentrationen von 10 ng/ml Phorbol 12-myristat 13-azetat, 1 µg/ml Ionomycin und 10 µg/ml Brefeldin A erreicht. Ein parallel mitgeführter Kontrollansatz enthält 10 µg/ml Brefeldin A ohne Phorbol 12-myristat 13-azetat und Ionomycin.

Nach 4-stündiger Restimulation unter Kulturbedingungen bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre werden die Zellen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, zweimal in Kulturmedium RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum gewaschen und in 50 µl Kulturmedium RPMI 1640 resuspendiert.

Zur Fixierung und Permeabilisierung werden die Zellproben in 1 ml ORTHO-PermeaFix™ aufgenommen, gründlich durchmischt und über 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Waschen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit 5% letalem Kälberserum (FCS), 1,5% Rinderserumalbumin und 0,0055% EDTA (PBS-Waschpuffer) sind die Zellproben in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit 1,0% Rinderserumalbumin und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren und bei -70°C lagerfähig.

Nach raschem Auftauen bei 37°C im Wasserbad werden die Zellproben in PBS-Waschpuffer gewaschen und bei der Überführung in 1 ml Micronic-Röhrchen auf die einzelnen Testansätze verteilt. Zu jeweils 5×10^4 Zellen in 50 µl PBS-Waschpuffer werden 5 µl des 1 : 10 verdünnten PE-konjugierten anti-Human IFN-γ Antikörpers sowie 2,5 µl FITC-konjugierter anti-CD4- oder 2,5 µl FITC-markierter anti-CD8- Antikörper gegeben und über 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Nach Entfernung nichtgebundener Fluorochrom-markierter Antikörper durch zweimaliges Waschen werden die Zellen zur Analyse, die vorzugsweise am COULTER EPICS XL-Durchflußzytometer erfolgt, in 350 µl PBS-Waschpuffer resuspendiert und in 12 x 75 mm Probenröhrchen überführt.

Zur Analyse TNF-α-, IL-2-, IFN-γ- und IL-4- produzierender Zellen in den CD4⁺- und CD8⁺ T-Lymphozyten-Populationen haben sich folgende Geräteeinstellungen als geeignet erwiesen:

Detector	Voltage	Gain	Total Gain	Mode
FSC	32	10.0	10.96	Lin
SSC	244	20.0	34.64	Lin
FL1	800	1.00		Log
FL2	692	1.00		Log

Discriminator (FSC) = 100

Compensation: FL1 - 1,0% FL2
FL2 - 14,5% FL1

Als Kontrollen eignen sich mit Phorbol 12-myristat 13-azetat und Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A stimulierte Zellen, die

- entweder mit PE- und FITC-konjugierten isotypischen Kontrollantikörpern oder
- vor der Anfärbung mit PE-markiertem Zytokin-Antikörper mit einem 20-fachen Überschuß des gleichen nicht markierten Zytokin-Antikörpers vorinkubiert wurden. Die Ergebnisse dieser Kontrollen entsprechen der intrazellulären Zytokin-Färbung bei weiter monokleären Kontroll-Zellen, die
- in Gegenwart von Brefeldin A ohne Zusatz von Phorbol 12-myristat 13-azetat und Ionomycin kultiviert wurden.

In Analogie zu diesem erläuterten Beispiel können nach dem gleichen erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung PE- und FITC-markierter Zytokin-Antikörper bei gleichzeitiger Anfärbung der Zelloberflächenmarker mit PE-Cy5-konjugierten monoklonalen Antikörpern zwei der vorgenannten Zytokine pro CD4⁺- bzw. pro CD8⁺-T-Zelle nachgewiesen werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit umfaßt den Nachweis Zytokin-produzierender Zellen in spezifischen Lymphozyten(sub)populationen, wie z. B. den CD4⁺ Gedächtniszellen, wobei neben intrazellulärem Zytokin zwei CD-Zelloberflächenmarker, in diesem Fall CD4 und CD45RO, anzufärben sind.

Patentansprüche

- Verfahren zur Bestimmung intrazellulärer Zytokine der Immunzellen in biologischen Körperflüssigkeiten und Organ- oder Gewebeproben mittels Durchflußzytometrie, dadurch gekennzeichnet, daß in vitro nach Restimulation der mononukleären Zellenfraktion, die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen werden können, vor der durchflußzytometrischen Analyse zuerst die Fixierung und Permeabilisierung der Immunzellen unter Verwendung von ORTHO PermeaFix™-Reagens und daran anschließend die Anfärbung von Zelloberflächenantigenen und intrazellulärem Zytokin mit Farbstoff-konjugierten monoklonalen Antikörpern erfolgen.
- Verfahren zur Bestimmung intrazellulärer Zytokine der Immunzellen in biologischen Körperflüssigkeiten und

Organ- oder Gewebeproben mittels Durchflußzytometrie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl Fixierung und Permeabilisierung der Immunzellen unter Verwendung von ORTHO PermeaFix™-Reagens als auch die Anfärbung von Zelloberflächenantigenen und intrazellulärem Zytokin mit Farbstoff-konjugierten monoklonalen Antikörpern in einem Einschnittverfahren erfolgen können.

3. Verfahren zur Bestimmung intrazellulärer Zytokine der Immunzellen in biologischen Körperflüssigkeiten und Organ- oder Gewebeproben mittels Durchflußzytometrie nach Anspruch 1 und 2 gekennzeichnet dadurch, daß die mit ORTHO PermeaFix™ fixierten und permeabilisierten mononuklearen Immunzellen in einer Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit Rinderserumalbumin (RSA) und Dimethylsulfoxid (DMSO) oder anderen geeigneten Medien eingefroren und bei etwa -70°C oder -193°C lagerbar sind und erst unmittelbar vor der durchflußzytometrischen Analyse nach dem Auftauen mit Farbstoffkonjugierten monoklonalen Antikörpern gegen Zelloberflächenantigenen und intrazelluläres Zytokin in einem Einschnittverfahren umgesetzt werden.

4. Verfahren zur Bestimmung intrazellulärer Zytokine der Immunzellen in biologischen Körperflüssigkeiten und Organ- oder Gewebeproben mittels Durchflußzytometrie nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung über eine adaptierte Vollblutmethode unter Verwendung von ORTHO PermeaFix™ als Fixierungs-, Permeabilisierungs- und Erythrozyten-Lyse-Reagens erfolgt.

5. Verfahren zur Bestimmung intrazellulärer Zytokine der Immunzellen in biologischen Körperflüssigkeiten und Organ- oder Gewebeproben mittels Durchflußzytometrie nach Anspruch 1 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß es zum Nachweis von Monokinen und Lymphokinen in Monozyten- bzw. Lymphozyten(sub)populationen und auch bei anderen Species anwendbar ist.